

| | |
|-----------|--|
| 氏名 | 酒 井 啓 |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第3569号 |
| 学位授与年月日 | 平成11年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当者 |
| 学 位 論 文 名 | Synergetic activation of outwardly rectifying Cl^- currents by hypotonic stress and external Ca^{2+} in murine osteoclasts (マウス破骨細胞における外向き整流性クロライド電流の低浸透圧 刺激と細胞外カルシウムによる共役的活性化) |
| 論文審査委員 | 主 査 教 授 松裏 修四 副主査 教 授 森井 浩世 副主査 教 授 山野 慶樹 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】骨吸収過程において破骨細胞は浸透圧、 Ca^{2+} 濃度、pH、など様々な細胞内外の微小環境要因の変化に曝露される。細胞膜を介した Cl^- イオン輸送は破骨細胞の機能と密接に関連すると推定されているが、骨吸収過程における Cl^- チャネルの役割は明らかでない。本研究では破骨細胞の Cl^- チャネルについて低浸透圧刺激による活性化メカニズムおよび細胞外 Ca^{2+} と浸透圧低下の相互作用を検討した。

【方法】5-8週令のマウス骨髄細胞と間葉系細胞株をビタミンDおよびデキサメサゾン存在下に共培養することにより分化させた破骨細胞の膜電流をホールセルパッチクランプ法により測定した。標準細胞内液(in mM)は150 K-glutamate, 3 MgCl_2 , 1 EGTA, 10 HEPES, 1 Na_2 -ATP, pH=7.3とし、低浸透圧溶液は標準細胞外液(145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, pH=7.3, 約300mosmol/l)のNaClを減少させることにより作成した。 Ca^{2+} の作用は細胞内あるいは細胞外の濃度を変化させることにより検討した。

【結果】1)破骨細胞に低浸透圧刺激(210mosmol/l)をおこなうと外向き整流性電流が活性化された。この電流は脱分極により急速に活性化され、不活性化をほとんど伴わず、 Cl^- チャネルブロッカーである4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbenesulfonate(DIDS)によりほぼ完全に抑制されるという特徴からこれまでに報告されている細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される外向き整流性 Cl^- 電流(OR_{Cl})と同一のタイプと推定された。また OR_{Cl} チャネルは有機陰イオン(ピルビン酸、グルタミン酸)に対する透過性を示した。2) OR_{Cl} の活性化は細胞内のATPを必要とし、細胞内pHのアルカリ化によって有意に抑制された($p < 0.05$)。3)低浸透圧刺激に対する OR_{Cl} の活性化はF-actinの重合阻害剤であるcytochalasin Dの細胞内投与で有意に抑制され($p < 0.05$)、細胞内G-actinに結合するDNase I投与では部分的に抑制された($p = 0.12$)が、アクチン脱重合作用のないcytochalasinであるchaetoglobosin Cでは抑制されなかった。4) OR_{Cl} の活性化は細胞外 Ca^{2+} を除去すると阻害され、細胞内 Ca^{2+} を20mMのEGTAでキレートすると部分的に抑制された。5)細胞外 Ca^{2+} 濃度を上昇させると(10mM)、より小さな浸透圧低下に対しても OR_{Cl} は活性化された。この OR_{Cl} の浸透圧変化に対する感受性の増大は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によっても認められた。

【考察】本研究により細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇と浸透圧低下は破骨細胞の Cl^- チャネルを共役的に活性化することが明らかになった。また Cl^- チャネル活性はpH、ATP、細胞のactin骨格構成などにより制御されることがから、骨吸収過程で曝露される様々な微小環境要因に応じて変化する破骨細胞の機能を調節していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

破骨細胞の骨吸収過程において、細胞内外の環境要因の変化に応じ破骨細胞の機能は各種イオン濃度やpHの影響をうけると考えられているが、この研究は、骨吸収過程におけるCl⁻チャネルの役割を明らかにするため、Cl⁻チャネルについて低浸透圧刺激による活性化メカニズムおよび細胞外Ca²⁺と浸透圧低下の相互作用について調べた研究である。

破骨細胞（マウス）は骨髓細胞と間葉系細胞株をビタミンDおよびデキサメサゾン存在下に共培養することで分化させたものを用いているが、この破骨細胞は低浸透圧刺激で、外液Ca²⁺濃度の上昇により活性化される外向き整流性Cl⁻電流(OR_{Cl})と同一タイプのCl⁻電流を生じることをCl⁻チャネルブロッカーの抑制作用から明らかにしている。このOR_{Cl}チャネルは有機陰イオン（ピルビン酸、グルタミン酸など）に対する透過性を示し、その活性化は細胞内ATPを必要とし、細胞内pHのアルカリ化で抑制されることを次に明らかにしている。更にこのOR_{Cl}の活性化はF-アクチンの重合阻害剤や細胞内G-アクチン結合薬物では抑制されるが、アクチン脱重合作用のないサイトカラシンでは抑制されず、細胞外Ca²⁺の除去で活性が阻害され、Ca²⁺濃度の上昇でより小さな浸透圧低下でもOR_{Cl}が活性化されることを明らかにしている。以上の研究結果は、浸透圧低下と細胞外Ca²⁺濃度の上昇は破骨細胞のCl⁻チャネルを共役的に活性化することを明らかにしたものであり、Cl⁻チャネル活性がpH、ATP、細胞のアクチン骨格構成などによって制御されることから、破骨細胞の機能を微小環境要因の変化に応じ調節していることを示唆していて、この研究は破骨細胞の機能の理解に寄与しており、本著者は博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断された。